

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

MICROCAPSULE USING S-SULFO SALT OF KERATIN AS STARTING MATERIAL FORMING WALL AND ITS PRODUCTION

Patent Number: JP5285375
Publication date: 1993-11-02
Inventor(s): YAMAUCHI KIYOSHI
Applicant(s):: KIYOSHI YAMAUCHI; others: 01
Requested Patent: ☐ JP5285375
Application Number: JP19920116820 19920409
Priority Number(s):
IPC Classification: B01J13/04 ; A61K9/50 ; A61K47/42 ; B01J13/02
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To produce microcapsules without using a harmful surfactant or cross-linking agent by using the S-sulfo salt of keratin as starting material forming the walls of microcapsules.
CONSTITUTION: An aq. soln. contg. the S-sulfo salt of keratin is mixed with an org. solvent insoluble or slightly soluble in water and the mixture is subjected to ultrasonic treatment, and/or vigorous stirring. The objective microcapsules are produced.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-285375

(43)公開日 平成5年(1993)11月2日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
B 0 1 J 13/04				
A 6 1 K 9/50	C	7329-4C		
47/42	D	7433-4C		
		8317-4G	B 0 1 J 13/ 02	A
		8317-4G		L

審査請求 未請求 請求項の数 5(全 5 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-116820

(22)出願日 平成4年(1992)4月9日

(71)出願人 592005788

山内 清

大阪府河内長野市北青葉台27-19

(71)出願人 000000952

鐘紡株式会社

東京都墨田区墨田五丁目17番4号

(72)発明者 山内 清

大阪府河内長野市北青葉台27-19

(74)代理人 弁理士 赤岡 迪夫

(54)【発明の名称】 ケラチンS-スルフォ塩を壁構成原料として用いるマイクロカプセル及びその製造方法

(57)【要約】

【目的】 本発明は、マイクロカプセルの壁構成原料として、ケラチンのS-スルホ塩を使用し、有害な界面活性剤や架橋剤を使用することなくマイクロカプセルを製造する方法及びこれによって製造したマイクロカプセルを提供することを目的とする。

【構成】 ケラチンのS-スルフォ塩を含む水溶液を水に不溶性または難溶性の有機溶媒と混合し、これを超音波処理及び／又は激しく攪拌することを特徴とするマイクロカプセルの製造方法及びこれによって製造されるマイクロカプセル。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ケラチンS-スルフォ塩を含む水溶液を水に不溶性または難溶性の有機溶媒と混合しこれを超音波処理及び／又は激しく攪拌することを特徴とするマイクロカプセルの製造方法。

【請求項2】 超音波処理及び／又は激しく攪拌する前に酸化剤を加えることを特徴とする、請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】 酸化能力を欠くガス雰囲気下においてケラチンS-スルフォ塩を含む水溶液を水に不溶性または難溶性の有機溶媒と混合しこれを超音波処理及び／又は激しく攪拌して乳濁液を調製した後、酸化剤を加えて攪拌することを特徴とするマイクロカプセルの製造方法。

【請求項4】 前記ケラチンS-スルフォ塩を含む水溶液が、スルフヒドリル基若しくはジスルフィド結合を有するタンパク質若しくはペプチド又はスルフヒドリル基若しくはジスルフィド結合を有するポリビニルアルコールを更に含むものであることを特徴とする、請求項1乃至3のいずれかに記載の製造方法。

【請求項5】 ケラチンS-スルフォ塩を壁構成原料として用いるマイクロカプセル。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ケラチンを壁材として含有し、染料、香料、医薬品、農薬、酵素その他の薬剤の包含に、又は酵素等の固定化に好適なマイクロカプセル及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来のマイクロカプセルの製造方法には化学的技法（界面重合法や *in situ* 重合法）、物理・化学的技法（水溶液や有機溶媒からの相分離法、噴霧凝固造粒法等）、物理・機械的技法等がある。界面重合法では、水相のモノマーと油相のモノマーを界面で重合させ、不溶性のポリマー被膜を形成させる。しかし、この反応のために入手できるモノマーは非天然系のもののみであり、得られるポリマー被膜は生体適合性がないか若しくは低いものに限られ、生分解性にも乏しい。また、芯物質とリアクタントとが反応する場合（例えば、タンパク質や酵素のように反応性のアミノ基やカルボキシル基を持つ場合など）、芯物質が反応により変化し得るという欠点もある。

【0003】 物理・化学的技法として最もよく知られている相分離法は、ポリマーの水溶液又は油溶液からなんらかの方法でポリマーの濃厚相を芯物質表面に析出させてマイクロカプセル化する方法であるが、系の酸性度、ポリマーの濃度等に強く影響されるため、これらの条件因子を熟知しておかなければならない。物理・機械的技法では、カプセル化のための原液を噴霧してこれを熱風と接触させ揮発性成分を蒸発させて乾燥するスプレードライニングが代表的であるが、装置が比較的柔軟性に乏

しく、同じ装置ではマイクロカプセルの物性を大きくは変化させることができない上、被乾燥液を乾燥室内に輸送できるものでなければならない。また、カプセルの壁構成原料に安定化剤としてドデシル硫酸ナトリウム等の界面活性剤が微量にせよ含まれている場合が多く、またはコラーゲン等を使用してカプセル化する場合には架橋剤として生体に有毒な物質を使用せざるを得ない場合が多い。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、カプセルの壁構成原料として、天然ケラチン含有物質より容易に調製されるケラチンS-スルフォ塩を使用することである。更に本発明の課題は、生体に適用するに当たり、ドデシル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤や毒性の強い架橋剤を使用することなく、且つ簡単な装置と方法により薬剤の含包に適したマイクロカプセルを提供することである。なお、本明細書において、「ケラチンS-スルフォ塩」とは、ケラチンを構成するアミノ酸残基のうちシステイン残基のスルフヒドリル基（-SH）が-S-SO₃⁻X⁺（X⁺はNa⁺又はK⁺等）に変換されているものをいう。

【0005】

【課題を解決するための手段】 羊毛、獣毛、羽毛等のケラチン含有物質をM2 S O3 -M 2 S4 O6（Mはナトリウムまたはカリウムを示す。）の水溶液（pH 7-9.5の緩衝液）で処理することにより、容易にケラチンS-スルフォ塩の水溶液が得られる〔Encyclopedia of Polymer Science and Technology, N.M. Bikales 編集、8巻、Interscience Publishers、New York（1964）、第1頁。以下「文献1」という。〕。このケラチンS-スルフォ塩は、原料としたケラチン含有物質によって変動するものの、スルフヒドリル基が-S-SO₃⁻X⁺（Xはナトリウム又はカリウム）の形に変換されたシステイン残基をアミノ酸100残基当たり通常4乃至10個有している。

【0006】 本発明者は、ケラチンS-スルフォ塩に基づくマイクロカプセルの製造の可能性について検討したところ以下の結果を得、これにより本発明を完成した。

（1） ケラチンS-スルフォ塩の水溶液を例えばトルエン、ヘキサン等の水に不溶性又は難溶性の有機溶媒と混合し、0乃至50℃にて10秒乃至10分間超音波照射することにより、該有機溶媒を芯物質として効率的に閉じ込めたマイクロカプセルが得られることを見出した。また、該混合の比率はケラチンSスルフォ塩の水溶液の濃度及びマイクロカプセルの使用目的によって異なるが、通常は（ケラチンS-スルフォ塩の水溶液体積／有機溶媒体積）＝0.3乃至3であることが好ましいことを見出した。

【0007】 （2） 上記項目（1）の混合物にケラチンS-スルフォ塩の-S-SO₃⁻X⁺基の数に対応し

て少量の過酸化水素、過ヨウ素酸ナトリウム等の酸化剤を加えた後、超音波照射し又はボルテックスミキサー若しくは攪拌モーター等で激しく攪拌しても、同様なマイクロカプセルが得られることを見出した。

【0008】(3) 上記項目(1)の混合物を、窒素ガスその他の酸化能力を欠くガス雰囲気下にて、超音波装置、ボルテックスミキサー又は攪拌モーター等で激しく攪拌して乳濁物とした上で、上記項目(2)に記載の酸化剤を添加混合してもマイクロカプセルが得られることを見出した。

【0009】(4) ケラチンS-スルフォ塩とスルフヒドリル基又はジスルフィド結合を有する他のタンパク質若しくはペプチドとを含む水溶液、又はケラチンS-スルフォ塩と非タンパク質でスルフヒドリル基若しくはジスルフィド結合を有する化合物とを含む水溶液を壁構成原料として使用し、項目(1)乃至(3)に記載の方法で処理してもマイクロカプセルが製造できることを見出した。

【0010】(5) 使用する有機溶媒に予め染料、香料、医薬品等の物質を溶解しておくことによって、上記項目(1)乃至(4)の方法により、これらが溶媒とともに効率よくマイクロカプセルに含包されることを見出した。

【0011】すなわち本発明は、ケラチンS-スルフォ塩含有水溶液を水に不溶性または難溶性の有機溶媒と混合しこれを超音波処理及び／又は激しく攪拌することを特徴とするマイクロカプセルの製造方法である。更に本発明は、該水溶液に超音波処理等の前に酸化剤を添加し又は酸化能力を欠くガス雰囲気下での超音波照射等の後に酸化剤を添加し攪拌することを特徴とするマイクロカプセルの製造方法である。本発明はまた、ケラチンS-スルフォ塩と、スルフヒドリル基又はジスルフィド結合を有するタンパク質若しくはペプチド又はスルフヒドリル基若しくはジスルフィド基を有する他の化合物とを含む水溶液を、上記と同様に処理することを中心とする、マイクロカプセルの製造方法である。

【0012】以下に、本発明のマイクロカプセルの製造に使用する公知成分及び製法について説明する。

(i) ケラチンS-スルフォ塩含有水溶液：以下に述べるケラチンS-スルフォ塩水溶液(項目i-a)単独、ケラチンS-スルフォ塩(項目i-a)に下記項目(i-b)若しくは(i-c)のいずれか一方を加えた混合物、又はケラチンS-スルフォ塩(i-a)に項目(i-b)及び(i-c)の双方を加えた混合物である。

【0013】(i-a) ケラチンS-スルフォ塩水溶液：羊毛、人髪、鶏羽、犬毛等ケラチンを含有物質より既知の方法(上記文献1参照)によって調製した。

【0014】(i-b) ケラチンS-スルフォ塩と混合する他のタンパク質又はペプチド：ケラチン、コラー

ゲン、ゼラチン、フィブリノーゲン、シルク、卵白リゾチーム、インスリン等のメルカプト基やジスルフィド結合を有するタンパク質；グリシル-グリシル-システイン(Gly-Gly-Cys)や(グリシル-グリシル-シスチン)2((Gly-Gly-Cyt)2)等のペプチド。

【0015】(i-c) 非タンパク質でメルカプト基又はジスルフィド基を持つもの：スルフヒドリル基を担持せしめたポリビニルアルコール(例えば、平均分子量2000に対してスルフヒドリル基が1乃至5個のもの)などの高分子の水溶液や2-メルカプトエチルエーテル(HSCH₂CH₂OCH₂CH₂SH)など有機ジスルフィド系化合物の水溶液。

【0016】(i i) 有機溶媒：水に難溶な炭化水素系溶媒であるトルエン、キシレン、ヘキサン、デカン、シクロヘキサン等が最も好ましいが、ジエチルエーテル等のエーテル型溶媒やフルオロシクロヘキサン、フロン113等の含ハロゲン炭化水素も使用できる。しかし、水に対する溶解度の低い溶媒であればこれらに限るものではない。

【0017】(i i i) 酸化剤：空気、酸素、過酸化水素、過ヨウ素酸ナトリウム、過硫酸アンモニウム、ヨウ素酸カリウム等が好ましく用いられる。また、これら酸化剤と共に、酸化促進剤又は触媒として、例えば鉄イオンを併用することができる。

【0018】(i v) マイクロカプセルの製法：

(i v-1) 超音波法：超音波装置は試料に超音波を照射することができる装置であればいかなるものでもよいが、マイクロカプセルの生成効率を高めるにはチタン等の金属プローブ先端より超音波を発生させるプローブ型の装置が好ましい。超音波照射条件は試料の成分と体積により適宜調整するが、一般にケラチンS-スルフォ塩水溶液と有機溶媒の総体積10mLに対し、30乃至50Wにて10秒乃至5分の間照射すればよい。なお、使用した有機溶媒によっては、マイクロカプセルの生成効率が低い場合があるが、その際は、超音波処理に先立ち微量の過酸化水素等の酸化剤を添加しておけば、生成効率を増大させることができる。また、窒素ガス等の酸化力を欠く気体雰囲気下にて超音波処理し、生じた乳濁状の混合物に酸化剤を加えてもよい。この手法は、芯物質が酸化されやすい場合に芯物質の酸化を防止しつつマイクロカプセルを形成する効果があり特に有用である。酸化剤の使用量は、おおむね原料中のS-スルフォ基(-S-SO₃⁻基)に対して1乃至6倍の酸化剤の分子個数に相当する量である。ケラチンS-スルフォ塩とそれ以外の壁構成原料[上記項目(i-b)及び(i-c)]の混合比は、ケラチンS-スルフォ塩に対して1乃至500重量%用いることができる。有機溶媒量は、芯物質の溶解性に応じて変わるが、ケラチンS-スルフォ塩と上記壁構成原料の水溶液総量に対して、0.

1乃至5倍体積、通常は0.5乃至2倍体積使用する。

【0019】(iv-2) 攪拌法：壁構成原料は上記項目(iv-1)と同様であるが、超音波処理の代わりにポルテックスミキサーで激しく振動させつつ攪拌するか、又は攪拌モーターにより激しく攪拌する。なお、処理前に、酸化剤を微量(S-スルフォ基1個に対して1乃至6倍の酸化剤の分子個数)加えておくか、攪拌して生じた乳濁状の混合物に酸化剤を加え、その後該酸化物がよく混合するよう、緩く攪拌してもよい。

【0020】(v) マイクロカプセルの単離は次のようにして行なうことができる。

(v-1) 処理液をそのまま濃縮するか又は乾燥する。乾燥は例えば凍結乾燥により行うことができる。

【0021】(v-2) 処理液を遠心して、マイクロカプセルを分離分離する。このままではマイクロカプセルの外部にマイクロカプセルの生成に与からなかった壁構成原料や酸化剤などが不純物として残る場合があるため、マイクロカプセル画分に水や緩衝液を加えて攪拌の後遠心し、再びマイクロカプセルを分離分離する。この操作を数回繰り返した後、マイクロカプセル分散液をそのまま利用するか、濃縮又は乾燥(凍結乾燥等)する。

【0022】(v-3) 処理液をセロファン膜等の半透膜を利用して、水や緩衝液あるいは香料、染料、生物活性物質などを溶解した水溶液に対して透析する。透析液をそのまま利用するか、濃縮又は乾燥(凍結乾燥等)する。

【0023】ケラチンS-スルフォ塩含有水溶液が不溶化してカプセル壁となる機構は、詳しくは明らかでない。しかし水中での超音波照射により水分子から酸化力の強い H_2O_2 や HO_2 が発生することはよく知られており【例えば、B. Lippitt, J.M. McCord, I. Fridovich, J. Biol. Chem., 247, 4688(1972)】、一方、本発明者は、 $R-S-SO_3^-Na^+$ (Rはメチル、ヘキシル等の炭化水素基)の水溶液を酸素存在下にて超音波処理することにより、相当するジスルフィド化合物($R-S-S-R$)が生ずることを見出している(K. Yamauchi, Bull. Chem. Soc. Jpn.に投稿予定)。この知見から推定して、ケラチンS-スルフォ塩のアミノ酸残基のうち、S-スルフォ化されたシステイン残基の $-S-SO_3^-$ 基がジスルフィド結合へと変換することによる高分子鎖間の架橋形成の結果によるものと考えられる。また酸化剤の添加はジスルフィド結合への変換を促進するものと考えられる。

【0024】カプセル直径は、ケラチンS-スルフォ塩含有水溶液の種類、ケラチンS-スルフォ塩含有水溶液に対する有機溶媒の体積比、超音波処理又は攪拌の態様や時間等により変動して一概に規定できないが、1.5重量%ケラチンS-スルフォ塩水溶液とトルエンの1:1体積混合物(6mL)を室温にて3分間、30Wにて

超音波処理した場合は、1乃至3 μm を主とした微小球であることが光散乱法により求められ、同サンプルを透過型電子顕微鏡で観察したところ、壁厚は約0.02 μm と極めて薄く、紙風船様の形態であった。

【0025】

【実施例】以下に実施例を挙げて更に詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

ケラチンS-スルフォ塩水溶液($X^+=Na^+$)の調製：羊毛(水洗し、ジクロロメタンで脱脂済み；5g)、 Na_2SO_3 (1.3g)、 $Na_2S_4O_6 \cdot 2H_2O$ (1.5g)、尿素(24g)と0.1Mのtris-緩衝液(pH9；50mL)の混合物を25℃で24時間攪拌した。不溶物を濾過して除去した後、濾液をセロファンチューブ(スペクトラ/ポア4)に加え、脱イオン水に対して透析し無色透明のケラチンS-スルフォ塩水溶液(110mL；1.3乃至1.8重量%)を得た。

【0026】【実施例2】広口試験管にケラチンS-スルフォ塩水溶液(ナトリウム塩；濃度は1.5重量%)(5mL)とトルエン(3mL)を入れ、マグネットバーで混合物を間接的に攪拌しつつ、25℃にて30Wの出力で3分間、超音波照射した。生じた懸濁液を2000回転/分で15分間遠心し、白濁固形物を分離し、水(10mL)を加え、攪拌後、同様に遠心した。同じ洗浄操作を更に2回繰り返した後、凍結乾燥した。得られた白色粉末状物質(約0.06g)は、透過型電子顕微鏡観察によれば、比較的均一なマイクロカプセルであり、壁厚は約0.02 μm 、直径1乃至3 μm であった。

【0027】【実施例3】広口試験管にケラチンS-スルフォ塩水溶液(ナトリウム塩；濃度は1.5重量%)(5mL)とトルエン(3mL)を加え、窒素ガス雰囲気下、25℃にて5分間超音波照射した。生じた白色懸濁液に30%過酸化水素水(0.07mL)を加え、緩く振盪した後、15分間放置した。次いで2000回転/分で15分間遠心し、白色固形物を分離し、水(20mL)を加え、攪拌後、同様に遠心した。同じ洗浄操作を更に2回繰り返した後、直ちに凍結乾燥した。得られた白色粉末状物質(約0.05g)の透過型電子顕微鏡観察によれば、生じたマイクロカプセルの直径は、ややばらつきがあるものの、2乃至5 μm であった。

【0028】【実施例4】広口試験管に下記の方法で製造したケラチンの1.3%水溶液(5mL)を加え、次いでケラチンS-スルフォ塩水溶液(ナトリウム塩；濃度は1.5重量%)(5mL)を加え、十分に振動攪拌した。次いでスダシIV(7mg)を溶解して含むトルエン(5mL)を加え、マグネットバーで混合物を間接的に攪拌しつつ、25℃にて30Wの出力で3分間、超音波処理した。生じた懸濁液を2000回転/分で15

分間遠心し、上層の固形物を分離し、純水（5mL）に分散した。同分散液を凍結乾燥することにより、約0.12gの粉末が得られた。分散液の電子顕微鏡観察によれば、比較的均一な粒子（直径1乃至3 μ m）を示した。加えた赤色色素の殆どを当該マイクロカプセルが内部に含むことは、凍結乾燥物をベンゼンに分散して色素を外液に漏出させて、その紫外分光分析を行った結果より確認した。

【0029】本実施例にて使用したセラチン水溶液は次の通りにして製造した。脱脂羊毛（メリノ種）10g、ドデシル硫酸ナトリウム6.0g、亜硫酸水素ナトリウム16g及び8モル濃度の尿素300mLの混合液を密

栓のうえ、50乃至55℃にて1時間、浴槽型超音波装置にて処理した。不溶物を濾過して除去し、濾液をセロファンチューブに入れ、外液として0.2重量%亜硫酸水素ナトリウム水溶液（3L）を用いて透析し、透析物より少量の不溶物を遠心により除いてセラチンを1.3重量%含有する（Lowry法）無色透明の水溶液約330mLを得た。なお、このセラチンはアミノ酸分析により、アミノ酸100残基当たりシステイン7.6個、シスチン0.8個を有し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、分子量約40000及び60000のタンパク質（それぞれ3乃至4割、5乃至6割）を主成分とする。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵
B01J 13/02

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所